

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de  
quesos artesanales provenientes de Lima y provincias**

**TESIS**

para optar el grado académico de Magíster en Microbiología

**AUTOR**

**Ruth Liliana Cristóbal Delgado**

**Lima – Perú**

**2008**

A mis padres, Tomás y Ester, y mi hermano Tomi, que día a día me dieron fortaleza, amor, comprensión y apoyo, porque estuvieron siempre a mi lado y me enseñaron que no debo rendirme ante los tropiezos o equivocaciones y puedo dar lo mejor de mí

A la Dra. Amparo, porque aprendí mucho de Ud, con cada revisión, me enseñó la dedicación al trabajo, por su apoyo y consejos muchas Gracias.

A la Dra. Dora, porque ha sido parte de todo mi recorrido profesional y de estudios, siempre he contado con su apoyo, comprensión y cariño. Gracias.

A mis amigos, quienes me apoyaron y compartieron la felicidad de un nuevo triunfo. Esto es para ellos, Anita, Pilar, Mary, Guisella, Melissa, Bertha, Carlota, Mili, Tania, Patty, Julio, Franklin, porque confiaron en mí a pesar de mis dudas y temores, y porque con su aliento y ánimos seguí adelante. Gracias.

A Jaqui, Chapita, Rulos, Beli y Rosmelia, porque formamos una amistad muy bonita que durará para siempre, estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos y siempre he contado con Uds aunque ahora no estemos todos juntos siempre los tengo presente. Para todos los chicos de la maestría de Microbiología 2005. Y para Manolo que no está con nosotros pero siempre formará parte de nuestro grupo en nuestras memorias.

A todos aquellos que no he mencionado pero que no he olvidado y que tuvieron una parte importante en este trabajo.

Y sobre todo a Dios, Gracias, por permitirme terminar una etapa más.

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Bacterias Ácido Lácticas .....	3
2.2 Bacteriocinas .....	4
2.2.1 Definición y características .....	4
2.2.2 Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas .....	6
2.2.3 Modo de acción .....	7
2.2.4 Bacteriocinas producidas por diversas bacterias .....	8
2.2.5 Bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus</i> .....	8
2.3 Investigación en el campo de las bacteriocinas a partir de alimentos de elaboración artesanal .....	9
2.3.1 En el Perú .....	11
III. OBJETIVOS .....	12
3.1 Objetivo General .....	12
3.2 Objetivos Específicos .....	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
4.1 Cepas .....	13
4.2 Muestra .....	13
4.3 Procesamiento de la muestra .....	14
4.4 Aislamiento de lactobacilos .....	14
4.5 Identificación de especies .....	15
4.6 Determinación de la actividad bacteriocinogénica .....	15
4.7 Caracterización fisicoquímica de la sustancia antibacteriana .....	16
4.7.1 Sensibilidad a catalasa .....	16
4.7.2 Sensibilidad a enzimas .....	16
4.7.3 Efecto de temperatura de conservación .....	17
4.7.4 Estabilidad térmica .....	17
4.7.5 Estabilidad a diferentes pH .....	17
4.7.6 Determinación de espectro antibacteriano .....	17

V. RESULTADOS .....	18
5.1 Caracterización microbiológica de aislados de lactobacilos .....	18
5.2 Actividad bacteriocinogénica .....	20
5.3 Caracterización fisicoquímica de la sustancia antibacteriana .....	23
5.3.1 Sensibilidad a catalasa .....	23
5.3.2 Sensibilidad a enzimas .....	23
5.3.3 Estabilidad térmica .....	24
5.3.4 Temperatura de conservación .....	25
5.3.5 Estabilidad a diferentes pH .....	25
5.3.6 Espectro antibacteriano .....	26
VI. DISCUSIÓN .....	27
VII. CONCLUSIONES .....	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
IX. ANEXOS .....	41

## RESUMEN

Con la finalidad de obtener bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas se recolectaron 33 muestras de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias y se aislaron 341 cepas de lactobacilos según los procedimientos establecidos por el Manual de Bergey. Las especies de lactobacilos aisladas con mayor frecuencia fueron *Lactobacillus casei* 56 % (191) y *Lactobacillus plantarum* 35.8 % (122). Sólo el 16.42 % (56/341) de los aislados presentaron actividad bacteriocinogénica frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos se ajustaron el pH a 6.5 para descartar la acción de ácidos orgánicos, además se determinó el péroxido de hidrógeno por acción de la catalasa. La constitución bioquímica de las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes fue determinada enzimáticamente utilizando pronasa E,  $\alpha$  -amilasa y lipasa. El 53 % (30) de las bacteriocinas fueron de naturaleza lipoproteica, 25 % (14) glicolipoproteica, 13 % (7) glicoproteica y 9 % (5) solamente proteica. Por otro lado, los sobrenadantes fueron sometidos a tratamientos térmicos de 60, 80 y 100 °C, a pH 4, 7 y 9, y a temperaturas de conservación de 4, 15 y 32 °C y se encontró que la termoestabilidad fue de 60 a 80 °C, el pH óptimo de 4 a 7 y la temperatura óptima de conservación de 4 a 32 °C. Las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de los diferentes aislados inhibieron el crecimiento de cepas de *Bacillus cereus* UA05, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Shigella sonnei* ATCC 9290 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Sin embargo, *Listeria innocua* UP01 fue resistente. El aislado identificado como *Lactobacillus plantarum* LM1 produjo la bacteriocina con los mejores parámetros fisicoquímicos experimentados y además presentó un amplio espectro de inhibición contra los microorganismos indicadores evaluados.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, bacteriocinas, lactobacilos, *Lactobacillus plantarum*, quesos artesanales

## ABSTRACT

The aim of this study was to get bacteriocin – producing lactic acid bacteria. For the purpose of this study, thirty three samples of artisanal cheeses from Lima and provinces were collected, and three hundred and forty one strains of lactobacilli were isolated according to the procedures established by Bergey's Manual. The most frequently isolated species were *Lactobacillus casei* 56% (191) and *Lactobacillus plantarum* 35.8% (122). Only 16.42% (56/341) of the isolates showed bacteriocinogenic activity against *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. The supernatants of bacteriocinogenic cultures were adjusted to pH 6.5 to rule out the action of organic acids, and it was determined the presence of hydrogen peroxide by the assay with catalase. The biochemical constitution of the bacteriocins present in the supernatants was determined using enzymatically pronase E,  $\alpha$  - amylase and lipase. The 53% (30) of bacteriocins was of lipoproteinaceous nature, 25% (14) of glycolipoproteinaceous nature, 13% (7) of glycoproteinaceous nature, and 9% (5) only of proteinaceous nature. On the other hand, the supernatants were exposed to various heat treatments at 60, 80, and 100°C, to pH variation at 4, 7, and 9, and to storage temperatures at 4, 15 and 32°C, and it was found that the thermostability of bacteriocins was found from 60 to 80°C, the optimum pH was from 4 to 7, and the optimum storage temperature was from 4 to 32°C. The bacteriocins present in the supernatants of the different isolates inhibited the growth of *Bacillus cereus* UA05, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Shigella sonnei* ATCC 9290 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. However, *Listeria innocua* UP01 was resistant. The isolate identified as *Lactobacillus plantarum* LM1 produced the bacteriocin with the best physicochemical parameters, and showed a broad spectrum of inhibition against the indicator microorganisms.

Key words: Lactic acid bacteria, bacteriocins, lactobacilli, *Lactobacillus plantarum*, artisanal cheeses

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de microorganismos que han sido utilizados en la manufactura de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal, como queso, yogurt, masato, vino y chicha de jora. En este grupo se encuentran los lactobacilos, que producen sustancias metabólicas, tales como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, ácido láctico y bacteriocinas de gran importancia en el control de microorganismos indeseables en los alimentos (1, 2).

Las bacteriocinas son sustancias proteicas con actividad antibacteriana, no son letales para las bacterias que las producen pero inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas filogenéticamente. Las bacteriocinas son termoresistentes, activas a pH bajo, inocuas para los consumidores y estables en los alimentos, son utilizados como conservantes naturales en la industria alimentaria (3, 4)

La nisina producida por *Lactococcus lactis* es la primera bacteriocina usada a escala comercial como conservante de alimentos, en quesos y productos cárnicos, data de la primera mitad del siglo pasado. La investigación en la obtención de nuevas bacteriocinas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos, cárnicos y vegetales se ha expandido en las dos últimas décadas, debido a que son consideradas como conservantes naturales seguros e inocuos, es decir sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) (4). Además, se han considerado dos importantes estrategias para la aplicación de las bacteriocinas en alimentos: una es la inoculación en el alimento de bacterias ácido lácticas que producen bacteriocinas en el alimento, y la otra es la adición directa de la bacteriocina purificada o semipurificada. Por ejemplo, plantaricina C producida por *Lactobacillus plantarum*, presenta actividad contra especies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus spp*, *Clostridium spp*, pero no es activa contra *Listeria innocua*. La acidocina A de *Lactobacillus acidophilus* es activa contra especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Listeria monocytogenes* pero no presenta actividad contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (4).

El uso de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas junto con otras tecnologías para la mejora de la seguridad en alimentos ha sido comprobado mediante la combinación con calor, agentes quelantes, antimicrobianos, sistema lactoperoxidasa, presión hidrostática y campo eléctrico pulsado, entre otras. La nisina, primera bacteriocina producida por

*Lactococcus lactis* y usada a nivel industrial, presenta su actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes* en langosta entre 60 ó 65 °C. También, cuando se usa con EDTA, citrato o lactato es efectiva contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium* y *E. coli* O157:H7. La pediocina AcH a 5000 AU/ml tiene un efecto sinérgico con el diacetato de sodio 0.3 – 0.5% contra *L. monocytogenes*. La nisina a 10 o 100 UI/ml tiene un efecto sinérgico con el sistema lactoperoxidasa en la inactivación de *L. monocytogenes* en leche descremada. Adiciones simultáneas o secuenciales de nisina a 50 UI/ml y curvaticina 13 a 160 UI/ml inducen un mayor efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* que cuando se usa una de ellas. La nisina (100 UI/ml) aumenta la presión de inactivación de *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus*. Además, aumenta la inactivación de células vegetativas de *Bacillus cereus* por tratamiento con campo eléctrico pulsado (16.7 kV/cm, 50 pulsos cada 0.002 ms de duración) (4).

Con la finalidad de obtener bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas se propusieron los siguientes objetivos en esta investigación: determinar especies de lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Asimismo, caracterizar fisicoquímicamente las bacteriocinas, determinar su espectro de inhibición frente a diversas bacterias patógenas y contaminantes de alimentos y determinar la bacteriocina con mayor potencial como bioconservante en alimentos.



## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las bacterias ácido lácticas se utilizan desde hace aproximadamente 4 mil años en la elaboración de alimentos. Su uso más común está relacionado con la producción de queso, yogurt, crema de leche y mantequilla. Comprenden un grupo de bacterias benignas que como producto final de su fermentación tienen al ácido láctico. Su distribución en la naturaleza es amplia así como en nuestro sistema digestivo. Sus aplicaciones más conocidas están relacionadas con la industria láctea pero también pueden presentar otros usos como en el curado de la carne, pescado y embutidos (5, 6).

Las bacterias ácido lácticas transforman la lactosa de la leche en ácido láctico, el que provoca cambios en la estructura de las proteínas (cuajan). De esta manera se modifica la textura del producto, pero existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades de los distintos productos resultantes. El ácido láctico le confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado, y otros derivados de la fermentación producen a menudo otros sabores o aromas (5, 6).

Las bacterias ácido lácticas tienen actualmente un gran potencial biotecnológico en la producción de alimentos destinados al consumo humano y animal. No sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas de los alimentos sino que sirven para el control de la proliferación de microorganismos patógenos debido a que producen bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácido láctico y otras sustancias. Entre éstas, se ha comprobado que los lactobacilos son beneficiosos para la salud humana y animal, por tal motivo estas bacterias pueden ser usadas en la conservación de ciertos alimentos usando las bacteriocinas como antimicrobianos (7).

En el grupo de bacterias ácido lácticas destaca el género *Lactobacillus*, ya sea de metabolismo homofermentativo o heterofermentativo, comprende cerca de 50 especies. Se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, no esporulados, sin motilidad, de metabolismo fermentativo, anaerobio facultativo, no reducen el nitrato, catalasa y oxidasa negativa y de requerimiento nutricionales complejos (7, 8).

Kandler y Weiss (7) agrupan a los lactobacilos en tres grupos tradicionales:

Grupo I, lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía Embden Meyerhoff, pero no pentosas ni gluconato. Ejemplo: *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*

Grupo II, lactobacilos heterofermentativos facultativos, fermentan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por vía Embden Meyerhoff o, al menos por algunas especies, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo limitantes de glucosa. También pueden fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por vía fosfocetolasa. Ejemplo: *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sake*

Grupo III, lactobacilos heterofermentativos obligados, fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). También fermentan pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. Ejemplo: *L. brevis*, *L. fermentum*

## **2.2 BACTERIOCINAS**

En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas los cuales en su mayoría son producidos por bacterias ácido lácticas (9). Este interés marcado sobre las bacteriocinas se debe a un conjunto de hechos, como la aprobación de la nisina como sustancia GRAS (Generally Reconized as Safe) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (FDA, siglas en inglés) en ciertos alimentos y el reconocimiento de que la mayoría de enfermedades asociadas al consumo de alimentos pueden ser atribuidas directamente a infecciones o intoxicaciones microbianas (9).

Los beneficios de las bacteriocinas, en especial de los lantibióticos, en salud humana y animal, son muy bien documentados. Presentan varias características y ventajas que las hacen particularmente atractivas: un espectro de inhibición específico, un sistema de autorregulación, estabilidad y procesos de producción costo – efectivo y el consumo en forma segura por los humanos por muchos siglos. Actualmente, la bioconservación en la industria alimentaria se basa en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus* (7, 10).

### **2.2.1 Definición y características**

El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen

bacteriano. Las bacteriocinas se definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por (i) la adsorción a receptores de membrana específicos; (ii) la actividad intraespecífica y, (iii) la biosíntesis letal. Estudios posteriores acerca de las colicinas evidenciaron que estas sustancias se caracterizaban, además, por (iv) poseer un componente proteico biológicamente activo; (v) ejercer un modo de acción bactericida y, (vi) por la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad (9, 11 – 13).

En la revisión de las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas de Tagg y colaboradores en 1976 se considera que los seis criterios mencionados anteriormente son válidos para las bacteriocinas prototipos o colicinas, pero las bacteriocinas de las Gram positivas muestran discordancias con algunos de los criterios establecidos, directamente en lo referente al espectro de acción, la presencia de receptores específicos, la localización de los determinantes genéticos y la biosíntesis letal. Por tanto, Tagg y colaboradores sugirieron que se deben considerar bacteriocinas a todas aquellas sustancias antimicrobianas bacterianas que, por lo menos, cumplan los criterios (iv) y (v) (9, 12, 13).

Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de origen peptídico, la mayoría no han sido bien caracterizadas aún. Por tanto, no se puede establecer propiedades en común, sin embargo las propiedades que principalmente se tienen en cuenta son las siguientes: naturaleza, tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia y estabilidad frente a pH. Aunque por definición las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica, se han descrito algunas que presentan en su molécula componentes glucocídicos y/o lipídicos, además de una fracción proteica. Así, por ejemplo, la leucocina S y la lactocina 27 son glicoproteínas, la mesenterocina 52 es de naturaleza lipoproteica y la fermenticina es un complejo glucolipoproteico. No obstante, estas conclusiones se obtuvieron empleando bacteriocinas parcialmente purificadas por lo que se requiere la purificación completa para determinar la presencia de las fracciones glucocídicas y/o lipídicas (11, 13, 14).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser generalmente estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras. La termorresistencia es una característica muy extendida entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas, dependiendo de una serie de

factores como el grado de purificación de las bacteriocinas, la presencia de moléculas termoprotectoras y el pH. La termoestabilidad disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente o a homogeneidad, como se ha comprobado con la lactacina B, la carnocina U – 149, y la sakacina P, entre otras. Debido a su naturaleza peptídica, las bacteriocinas pueden ser degradadas por enzimas digestivas, resultando inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades fisicoquímicas les dan resistencia a tratamientos térmicos y debido a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos (11, 13).

### **2.2.2 Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas**

Klaenhammer en 1993 propuso la clasificación de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas en cuatro grupos basados en la estructura y naturaleza química, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, estabilidad térmica y modo de acción (9, 12, 13).

Clase I: lantibióticos, bacteriocinas de pequeño tamaño molecular ( $< 5$  KDa) que contienen aminoácidos poco usuales y modificados postraduccionalmente.

Clase II: bacteriocinas de pequeño tamaño molecular ( $< 10$  KDa), termoestables, que no contienen aminoácidos modificados y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática. Éstas se dividen en los siguientes subgrupos:

IIa: péptidos que presentan en su extremo N – terminal la secuencia YGNGV (Y, tirosina, G, glicina, N, asparagina y V, valina), denominada secuencia consenso, y que muestran una potente actividad inhibidora frente a *Listeria spp.*

IIb: bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes y que actúan mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana citoplasmática. IIc: bacteriocinas tiol – activadas o péptidos que para ejercer su actividad antimicrobiana requieren la presencia de residuos de cisteína reducidos, representadas únicamente por la lactococcina B.

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular ( $> 30$  KDa) y termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos de  $60 - 100^{\circ}\text{C}$  durante  $10 - 15$  minutos). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por *Lactobacillus*.

Clase IV: bacteriocinas complejas, constituidas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucocídicas necesarias para su actividad biológica.

Actualmente se han caracterizado bioquímicamente y genéticamente las bacteriocinas y por tanto su clasificación ha sido objeto de modificaciones. Nes y colaboradores en 1996 han propuesto una nueva clasificación de las bacteriocinas en la cual se mantienen las clases I, II y III establecidas por Klaenhammer en 1993 y se sugiere que se debe completar la caracterización bioquímica de las bacteriocinas constituidas aparentemente por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas (clase IV) antes de reconocerlas como una clase de bacteriocinas (9, 12, 13). En lo que respecta a las bacteriocinas de la clase II, por una parte, se excluye el grupo de las bacteriocinas tiol – activadas (grupo IIc de la clasificación de Klaenhammer en 1993), ya que los trabajos realizados por Venema y colaboradores en 1996 han puesto de manifiesto que ni la presencia ni el estado reducido de los residuos de cisteína de la lactococcina B son esenciales para su actividad biológica (9). Por otra parte, estos autores proponen agrupar las bacteriocinas de la clase II en los siguientes grupos:

(IIa) Bacteriocinas del tipo pediocina o péptidos que contienen la secuencia consenso (YGNGV) en su extremo N – terminal y que muestran una potente actividad anti *Listeria*

(IIb) Bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes

(IIc) Bacteriocinas secretadas a través de la ruta general de secreción (GSP, del inglés General Secretary Pathway) dependiente de un péptido señal (sistema *sec* dependiente)

### **2.2.3 Modo de acción**

El modo de acción de las bacteriocinas de bacterias lácticas es la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles. Este proceso induce la disipación de la fuerza motriz protónica. La formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica (fuente de energía celular) promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula. Además de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario (9, 11 – 14).

#### **2.2.4 Bacteriocinas producidas por diversas bacterias**

Las primeras referencias que se tienen acerca del estudio de las bacteriocinas datan de 1928, cuando se publicaron dos trabajos que describían la actividad antimicrobiana de una cepa de *Streptococcus lactis* frente a *Lactobacillus delbrueckii* debido a un compuesto proteico, dializable y termoestable. En 1947, Matick y Hirsch describieron un compuesto antimicrobiano producido por varias cepas de estreptococos del grupo N de Lancefield y lo denominaron nisina. Su aplicación se comenzó a estudiar en la década del '50 dirigido a la industria alimentaria. En 1951, Hirsch sugirió el uso de cepas productoras de nisina para el control de la formación de gas producidos por clostridios en quesos. En 1959, se autoriza el uso de la nisina como aditivo alimentario por una Comisión de Expertos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) / Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualmente su uso como conservante alimentario se ha ampliado a más de 50 países en el mundo. Se ha descrito el uso de la nisina en el área farmacéutica. La nisina presenta actividad inhibitoria frente al crecimiento y colonización de *Helicobacter pylori* en la enfermedad de úlcera péptica. Además ha sido usada para inhibir el crecimiento de patógenos multidrogoresistentes como *Staphylococcus* y *Streptococcus spp.* Bower y colaboradores usaron catéteres y tubos de traqueotomía tratados con nisina y observaron un efecto protector corto contra bacterias Gram positivas sin reacciones adversas. Las aplicaciones farmacéuticas fueron encontradas en otros lantibióticos. Epidermina y gallidermina, bacteriocinas producidas por *Staphylococcus epidermidis* y *S. gallinarum* respectivamente, están siendo utilizadas para el tratamiento del acné juvenil debido a su actividad específica y potente contra *Propionibacterium acnes*. También se ha sugerido el uso de lantibióticos en alimentos de pacientes inmunosuprimidos (7, 9, 10, 15).

#### **2.2.5 Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus***

Las primeras referencias bibliográficas sobre la producción de bacteriocinas por el género *Lactobacillus* datan de los años 60, cuando De Klerk y Coetzee en 1961 analizaron 189 cepas de lactobacilos homo y heterofermentativos y observaron que, aproximadamente, el 6% producían sustancias bactericidas frente a otros miembros de la familia Lactobacillaceae (9). Desde entonces se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*), heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sake*) y heterofermentativas obligadas (*L. fermentum*), muchas de ellas

aisladas de productos cárnicos, encurtidos y bebidas. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo patógenos. Una de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* aislado de productos lácteos es plantaricina C que mata células sensibles a nivel de membrana citoplasmática. Las plantaricinas S y T de *L. plantarum* aisladas de aceitunas verdes fermentadas tienen acción contra varias bacterias Gram positivas incluyendo clostridios y propionibacterias (16).

### **2.3 INVESTIGACIÓN EN EL CAMPO DE LAS BACTERIOCINAS A PARTIR DE ALIMENTOS DE ELABORACIÓN ARTESANAL**

La elaboración artesanal de quesos en las diversas regiones geográficas del Perú no necesariamente se encuentra bajo un control sanitario de modo que se pueda prevenir la aparición de patógenos como *Listeria*, la cual tiene la capacidad de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, resistir bajos pH y tolerar concentraciones altas de sal. Los quesos, son una fuente importante de bacterias lácticas, así como de microorganismos patógenos cuando existe una inadecuada manipulación y conservación. Este producto lácteo es de gran consumo en la población, por lo que requiere un control en el proceso de elaboración, conservación y manipulación, además del diseño de medidas alternativas para su conservación mediante el uso de lactobacilos productores de bacteriocinas y otras sustancias antimicrobianas naturales (17).

Diversos trabajos se han realizado en la búsqueda de bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) que pudieran competir con patógenos alimentarios clásicos. Los alimentos usados para la obtención de estas cepas con capacidad antimicrobiana son de elaboración artesanal. Hay que resaltar que en los trabajos, el género *Lactobacillus* presenta el mayor número de aislados con capacidad bactericida frente a patógenos como *Listeria*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*, y además hubo ensayos en lo que se enfrentó con Gram negativas como *E. coli* observando una capacidad bactericida pero en menor grado (13, 17 – 24).

Savado y col. (2004) determinaron ocho cepas de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de muestras de leche fermentadas. Las cepas correspondían a las especies de *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus spp*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Lactococcus spp*. Las bacteriocinas mostraron actividad antibacteriana

contra *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* usando la prueba de difusión en agar. La inhibición fue mayor frente a las bacterias indicadoras Gram positivas. Las actividades de las bacteriocinas se perdieron después del tratamiento con enzimas proteolíticas (quimiotripsina, tripsina, pepsina), mientras que el tratamiento con lipasa, catalasa y  $\alpha$ -amilasa no afectaron la actividad de las bacteriocinas (23). De Martinis y col. (2003) obtuvieron seis cepas productoras de bacteriocinas a partir de productos cárnicos empacados al vacío. Las especies identificadas fueron *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc spp.* Para determinar el título de actividad inhibitoria se usó el ensayo de dilución crítica usando *Lactobacillus sake* y *Listeria monocytogenes* como microorganismos indicadores. Los compuestos inhibitorios fueron caracterizados con respecto a su estabilidad a la acción de enzimas, termoestabilidad, variación de pH y el modo de acción (bactericida o bacteriostático) hacia *Listeria monocytogenes*. A diferencia del trabajo anterior, ninguna de las bacteriocinas fue destruida por pepsina, pero fueron destruidas por proteinasa K, tripsina y  $\alpha$ -amilasa. Las cepas más activas contra *Listeria monocytogenes* fueron *Lactobacillus sake* y *Leuconostoc mesenteroides*. Las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* presentaron la más alta estabilidad térmica. La bacteriocina de *Lactobacillus sake* fue la más estable a la variación de pH. Todas las bacterias ácido lácticas produjeron bacteriocinas en el rango de temperatura de 4 a 30°C y esta propiedad es la de mayor importancia ya que constituye para su trabajo un interés en aplicaciones futuras en productos cárnicos refrigerados (19).

En otro trabajo similar al de De Martinis, Bromberg y col. (2004) evaluaron 285 muestras de productos cárnicos para determinar presencia de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas por la prueba del sándwich. De 174 de estas muestras, 813 cepas de bacterias lácticas fueron aisladas. Estas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y/o *Listeria innocua*. Cuando fueron evaluadas por el ensayo de difusión en agar, 128 de éstas inhibieron el crecimiento de cepas indicadoras. El espectro de inhibición de la actividad de los aislamientos fue evaluado frente a un rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas. *S. aureus* fue el indicador más sensible a la prueba, mientras que *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus plantarum* fueron los más resistentes. Todos los compuestos producidos por bacterias ácido lácticas fueron completamente o parcialmente inactivados por algunas de las enzimas proteolíticas, lo cual indica su naturaleza proteica (18).



Todorov y col. (2001) aislaron y caracterizaron parcialmente bacteriocinas de bacterias ácido lácticas aisladas de cerveza. Esta bebida era de preparación artesanal producida a partir de maíz y trigo en varias regiones de África. De 48 aislamientos, 10 produjeron bacteriocinas contra *Lactobacillus casei*. Las cepas fueron identificadas como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis subespecie. lactis*. Las bacteriocinas permanecieron activas después de un tratamiento térmico por 20 minutos a 121°C, a la incubación a pH 2 – 12 por 2 horas, y fueron inactivadas después del tratamiento con enzimas proteolíticas. Ningún cambio en la actividad antimicrobiana se reportó después del tratamiento con  $\alpha$  – amilasa. Todas las bacteriocinas mostraron actividad bacteriostática contra *Lactobacillus casei* (24).

### 2.3.1 En el Perú

En Perú, existen diversos alimentos fermentados, elaborados artesanalmente que pueden ser productores de bacterias ácido lácticas con capacidad de producción de bacteriocinas. Estos alimentos son: queso, yogurt, chicha de jora, masato, por mencionar algunos. Francia y col. (2002) realizaron un trabajo similar al propuesto acerca de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de quesos frescos artesanales de Lambayeque. Las bacterias lácticas que aislaron correspondieron a los géneros *Lactobacillus*., *Pediococcus* y *Lactococcus*. Las cepas productoras de bacteriocinas se reconocieron mediante la inhibición del crecimiento de *Listeria spp* utilizada como cepa indicadora. Se identificaron 44 cepas de *Lactobacillus*, de los cuales 20 se reconocieron como *L. plantarum* y 24 como *L. casei*, 12 cepas fueron identificadas como *Pediococcus sp.* y 25 como *Lactococcus spp.* El 90% de las cepas de *L. plantarum* y el 50% de *L. casei* inhibieron el crecimiento de *Listeria spp*. El menor porcentaje de cepas con capacidad inhibitoria correspondieron a *Pediococcus* (33%) y *Lactococcus* (8%), respectivamente. La mayor producción de bacteriocina se observó con *L. plantarum* (17).

Sedano (2006) aisló 81 cepas de *Lactobacillus* de 11 muestras de masato procedentes de Pucallpa – Ucayali. De éstas, 41% correspondieron a *L. plantarum*, 16% a *L. alimentarius*, 15% a *L. acidophilus*, 11% a *L. casei* y en menor porcentaje *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. amylophilus* y *L. coryniformis*. De las 81 cepas, 8 cepas de lactobacilos presentaron actividad inhibitoria, y solamente una correspondiente a *L. plantarum* se demostró que la sustancia inhibitoria no era un ácido orgánico ni peróxido de hidrógeno, pudiendo corresponder a una bacteriocina (25).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar especies de lactobacilos productores de bacteriocinas

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar lactobacilos de quesos artesanales de Lima y provincias según metodología establecida por el Manual de Bergey
- Identificar las especies de lactobacilos mediante pruebas bacteriológicas convencionales
- Seleccionar lactobacilos productores de bacteriocinas
- Caracterizar fisicoquímicamente las bacteriocinas de mayor espectro de inhibición
- Determinar el espectro antibacteriano de las bacteriocinas obtenidas
- Determinar la bacteriocina con mayor potencial para ser considerado como bioconservante

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Cepas**

Las cepas bacterianas de colección usadas en la investigación fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), así como de la Universidad Nacional de la Patagonia (UNP), Argentina. Las especies fueron las siguientes:

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (UPCH)

*Lactobacillus acidophilus* L1 (UPCH)

*Bacillus cereus* UA05 (UPCH)

*Listeria innocua* UP01 (UNP)

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (UPCH)

*Escherichia coli* ATCC 10536 (UPCH)

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (UPCH)

*Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 (UPCH)

*Shigella sonnei* ATCC 9290 (UPCH)

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (UPCH)

### **4.2 Muestra**

Se recolectaron treinta y tres muestras de quesos artesanales de los principales mercados de los departamentos de Lambayeque, La Libertad, Lima, Ica, Arequipa, Cajamarca, Ayacucho, Cusco, Ancash y Huancavelica de Marzo a Octubre del 2006.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. De cada queso se tomó una porción de aproximadamente 300 g, la cual se colocó en una bolsa estéril debidamente codificada. Las muestras se transportaron a 4 °C y se procesaron dentro de las 12 horas.

### **4.3 Procesamiento de la muestra**

De cada porción de queso, se realizó dos cortes radiales desde el centro del queso usando un cuchillo estéril.

De cada muestra, se tomó 25 g de queso y se homogenizó con 225 ml de caldo MRS, (Merck, pH 6.5) (Anexo N° 1) por 1 minuto usando como homogenizador una licuadora. Luego, se procedió a realizar diluciones decimales hasta  $10^{-4}$  en frascos con 90 ml de caldo MRS. De la dilución  $10^{-4}$ , se tomó 0.1 ml y se sembró en superficie por diseminación con espátula de Drigalsky por duplicado en placas con agar MRS (Merck, pH 6.5). Las placas se incubaron a 37 °C por 72 horas en jarras de anaerobiosis usando sobres de Anaerogen (Oxoid) (Anexo N° 2 – Esquema N° 1 y 2).

### **4.4 Aislamiento de lactobacilos**

Después del tiempo de incubación, se seleccionaron 5 colonias al azar de cada placa. Se anotaron las características morfológicas de las colonias como: color, tamaño (mm), aspecto y forma usando como referencia las características indicadas en el Manual de Bergey (8) (Cuadro N° 1). Se realizaron coloraciones de Gram a todas las colonias, a la vez se detectó la presencia de esporas. A continuación se realizaron tres pasajes sucesivos en caldo MRS para estabilizar los aislados. Los bacilos Gram positivos no esporulados se sometieron a las pruebas de catalasa y oxidasa, así como, la prueba de Voges Proskauer (VP) para determinar la producción de acetoina, motilidad para determinar presencia de flagelos e hidrólisis de arginina (Anexo N° 1).

**Cuadro N° 1. Características Generales para la Identificación del Género**  
***Lactobacillus* según Manual de Bergey (8)**

<b>Características</b>	<b>Género <i>Lactobacillus</i></b>
Morfología de la colonia y del cultivo	Colonias blanquecinas o cremas, pequeñas, de aproximadamente de 1 – 5 mm de diámetro. Con borde entero, convexo, liso, brioso, sin pigmento
Coloración Gram	Bacilos Gram positivos largos, cortos, rectos o ligeramente curvados
Coloración de esporas	Bacilos no esporulados
Catalasa	Negativa
Oxidasa	Negativa
Motilidad	Negativa
Voges Proskauer (VP)	Negativa
Hidrólisis de arginina	Negativa

#### **4.5 Identificación de especies**

La identificación de las especies de lactobacilos se realizó mediante la prueba de asimilación de carbohidratos usando como medio base el caldo para carbohidratos con indicador de Andrade (Anexo N° 1). Los carbohidratos usados fueron: arabinosa, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, melibiosa, rafinosa, sacarosa, salicina, sorbitol y xilosa. Las marcas comerciales usadas para este ensayo fueron Sigma y Merck. El formato de datos aplicado para cada uno de los aislados se observa en el Anexo N° 3.

#### **4.6 Determinación de la actividad bacteriocinogénica**

Cada aislado identificado se cultivó en caldo MRS pH 6.5 a 37°C por 18 horas en anaerobiosis y se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos usando una centrífuga Sorvall, modelo GLC – 2B. El sobrenadante obtenido se filtró con discos de filtro de membrana para jeringa de 0.2 µm (Pall) y se colectó en un tubo de ensayo estéril para determinar la actividad bacteriocinogénica usando la técnica de difusión por pocillos y las pruebas de

caracterización fisicoquímica. El sobrenadante fue neutralizado con NaOH 2.5N hasta llegar a un pH de 6.5 para descartar que la acción inhibitoria se deba a ácidos orgánicos.

En placas petri estériles vacías de 90 x 100 mm se colocó 1 ml de inóculo de la cepa indicadora, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a escala de MacFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml). Luego, se agregó 20 ml de agar Mueller Hinton (Merck), licuado a menos de 50°C y se homogenizó el inóculo con el agar. Después de solidificar, se procedió a realizar pocillos de 6 mm de diámetro sobre el agar usando sacabocados estériles de acero. A cada pocillo, se agregó 100 µl del sobrenadante obtenido de los cultivos de 18 horas. Como control positivo se usó el sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* L1 y como control negativo caldo MRS estéril a pH 6.5. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas sin invertirlas en aerobiosis. Después de la incubación se realizó la medición de los diámetros de los halos de inhibición (mm) usando un vernier (Anexo N° 2 – Esquema N° 3).

#### **4.7 Caracterización fisicoquímica de la sustancia antibacteriana**

##### **4.7.1 Sensibilidad a catalasa**

A los sobrenadantes que presentaron actividad antibacteriana y con pH ajustados a 6.5 con NaOH 2.5N, se trataron con una solución estéril de catalasa (Sigma) a una concentración de 2 mg /ml, usando como diluyente de la enzima el buffer fosfato sódico 0.01 M, pH 7.2. Las muestras se incubaron a 37 °C por 1 hora. Después se realizó el ensayo de difusión por pocillos. La prueba de sensibilidad a catalasa se aplica para descartar que la actividad inhibitoria sea debido a la producción de peróxido de hidrógeno.

##### **4.7.2 Sensibilidad a enzimas**

Los sobrenadantes que presentaron actividad antibacteriana fueron sometidos a un tratamiento con la enzima pronasa E (Merck), a una concentración final de 2 mg/ml de enzima, usando como diluyente de la enzima el buffer fosfato sódico 0.01 M, pH 7.0. Los sobrenadantes tratados se incubaron a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, se determinó la actividad antibacteriana de los sobrenadantes tratados usando la técnica de difusión por pocillos. De la misma manera, se procedió con las enzimas  $\alpha$  - amilasa y lipasa (Merck). Esta prueba se utiliza para determinar la naturaleza de la bacteriocina.

#### **4.7.3 Efecto de temperatura de conservación**

Los sobrenadantes con actividad antibacteriana fueron incubados a 4 °C, 15 °C y 32 °C por 30 días. Después del periodo de incubación, se determinó la actividad antibacteriana de los sobrenadantes tratados usando la técnica de difusión por pocillos, de la misma manera como se procedió en los ensayos anteriores. Para la temperatura de 4 °C se usó una refrigeradora y para las temperaturas de 15 °C y 32 °C se usaron estufas graduadas a las temperaturas indicadas.

#### **4.7.4 Estabilidad térmica**

Los sobrenadantes seleccionados con actividad antibacteriana se colocaron en microtubos de 1.5 ml con cierre hermético y se calentaron en baño de agua a 60 °C por 30 minutos. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión por pocillos como en los ensayos anteriores. Se procedió de la misma manera para las temperaturas de 80 °C por 10 minutos y 100 °C por 5 minutos.

#### **4.7.5 Estabilidad a diferentes pH**

A los sobrenadantes de las muestras activas se les ajustaron el pH a 4 con NaOH 2.5 N y se incubaron a 20 °C por 2 horas. Luego del tratamiento, se ensayó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión por pocillos. Se procedió de la misma manera para los valores de pH 7 y 9. La medición de pH se realizó usando un potenciómetro (Beckman – Zeromatic, modelo SS – 3).

#### **4.7.6 Determinación de espectro antibacteriano**

Después de realizar los ensayos anteriores y determinar que la acción inhibitoria de los sobrenadantes es debida a bacteriocinas, éstos fueron enfrentados a bacterias patógenas y contaminantes Gram positivas y Gram negativas usando la técnica de difusión por pocillos. Las bacterias usadas fueron *Bacillus cereus* UA05, *Listeria innocua* UP01, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Shigella sonnei* ATCC 9290 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1 Caracterización microbiológica de aislados de lactobacilos**

De las 33 muestras procesadas se obtuvieron 341 aislados de lactobacilos confirmados por pruebas de tinción Gram, coloración de esporas, catalasa, oxidasa, motilidad, VP e hidrólisis de arginina que se indican en el Cuadro N° 1. Mediante la prueba de asimilación de carbohidratos se identificaron las siguientes especies de lactobacilos y número de aislados: *L. casei* (191), *L. plantarum* (122), *L. acidophilus* (10), *L. bulgaricus* (8), *L. lactis* (4), *L. fermentum* (3), *L. helveticus* (2) y *L. brevis* (1). El perfil de asimilación de carbohidratos de las especies de lactobacilos identificadas se muestra en el Cuadro N° 2.

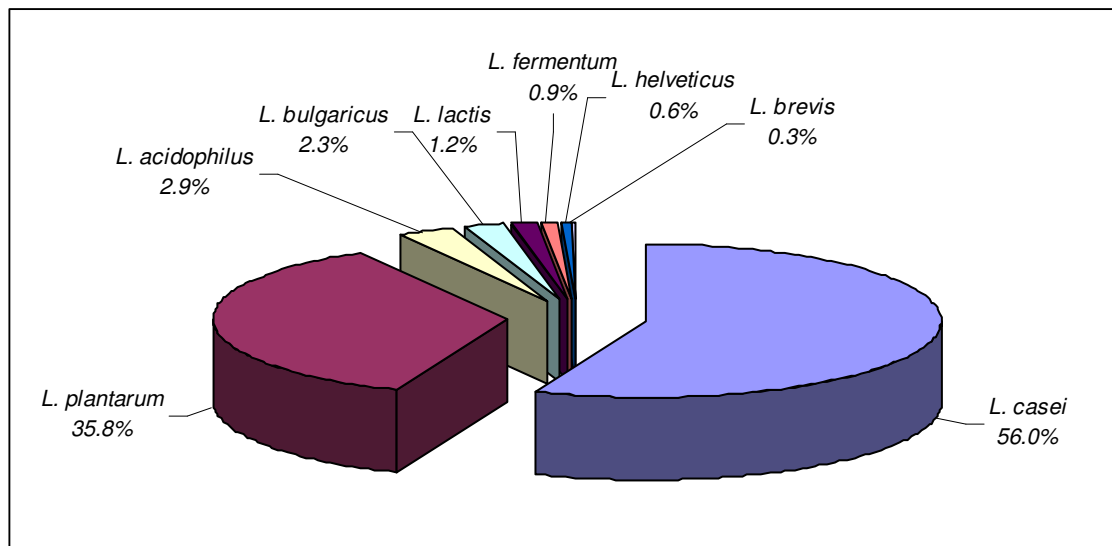
Las especies de lactobacilos que se aislaron de quesos artesanales en mayor proporción fueron *L. casei* (56%) y *L. plantarum* (35.8%). Las otras especies de lactobacilos se presentaron en menor porcentaje como se muestra en la Figura N° 1.



**CUADRO N° 2. Identificación de Especies de Lactobacilos por Pruebas de Asimilación de Carbohidratos**

ESPECIE DE LACTOBACILO	NÚMERO DE AISLADOS	CARBOHIDRATOS														
		Arabinosa	Esculina	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Inositol	Lactosa	Maltosa	Manitol	Melibiossa	Rafinosa	Sacarosa	Salicina	Sorbitol	Xilosa
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	8	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus casei</i>	191	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	4	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	122	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Total	341															

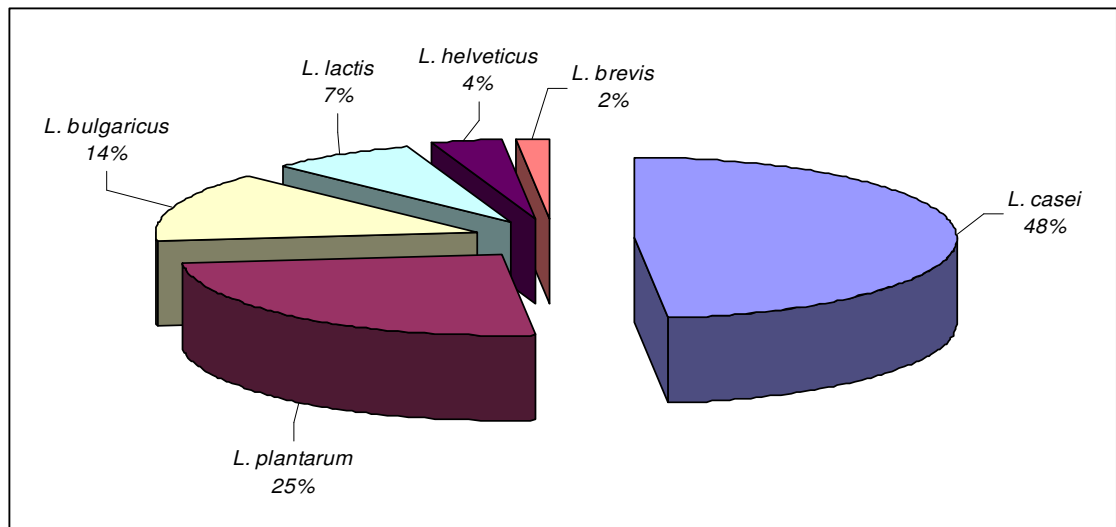
(-) no asimila, (+) asimila



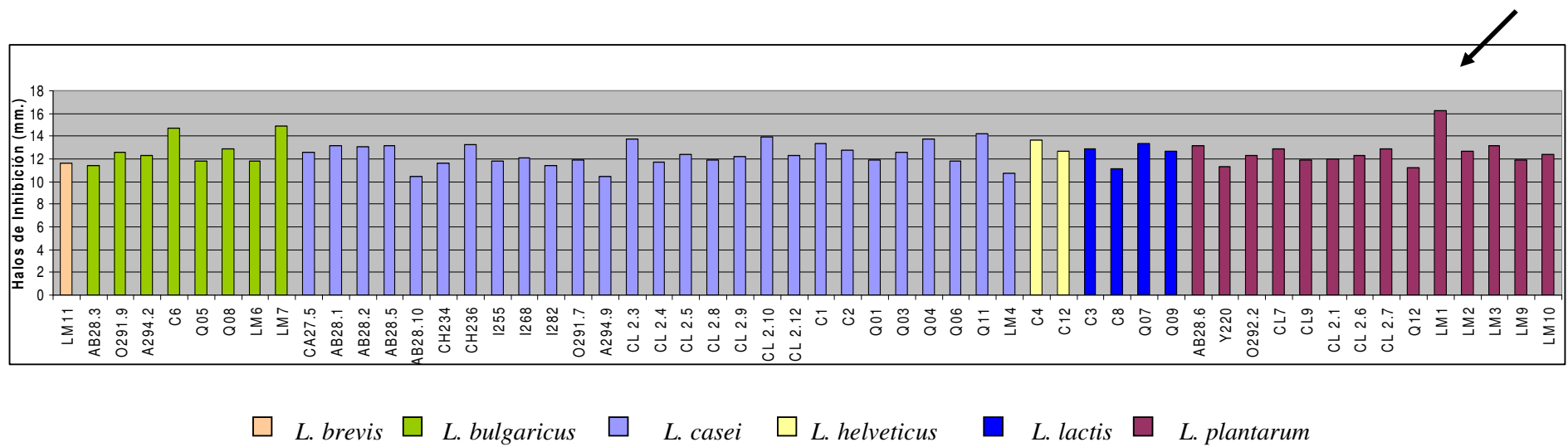
**FIGURA N° 1.** Distribución porcentual de especies de lactobacilos aislados de quesos artesanales procedentes de Lima y provincias

## 5.2 Actividad bacteriocinogénica

De los 341 aislados identificados como lactobacilos, sólo 56 (16.42%) presentaron una actividad de inhibición frente al microorganismo indicador *L. acidophilus* ATCC 4356 después de su ajuste de pH a 6.5 con NaOH 2.5 N, indicando que la acción inhibitoria no es debida a ácidos orgánicos. Los sobrenadantes de las especies de *L. plantarum* y *L. casei* presentaron las mayores actividades de inhibición frente al organismo indicador (Figura N° 2). Ninguno de los aislados de *L. acidophilus* y *L. fermentum* presentaron actividad bacteriocinogénica. De los 56 sobrenadantes, el de *L. plantarum* LM1 presentó la mayor inhibición con un halo de 16.3 mm como se aprecia en la Figura N° 3.



**FIGURA Nº 2. Distribución porcentual de especies de lactobacilos con actividad bacteriocinogénica**



**FIGURA N° 3. Actividad bacteriocinógena de sobrenadantes de lactobacilos.** El sobrenadante de *L. plantarum* LM1 (flecha negra) presenta la mayor actividad inhibitoria.

Estos sobrenadantes fueron sometidos a pruebas fisicoquímicas modificadas, tales como: la prueba de sensibilidad a catalasa,  $\alpha$  - amilasa, lipasa y pronasa E para determinar la naturaleza de la sustancia inhibitoria, resistencia a temperatura, variación de pH y temperaturas de conservación.

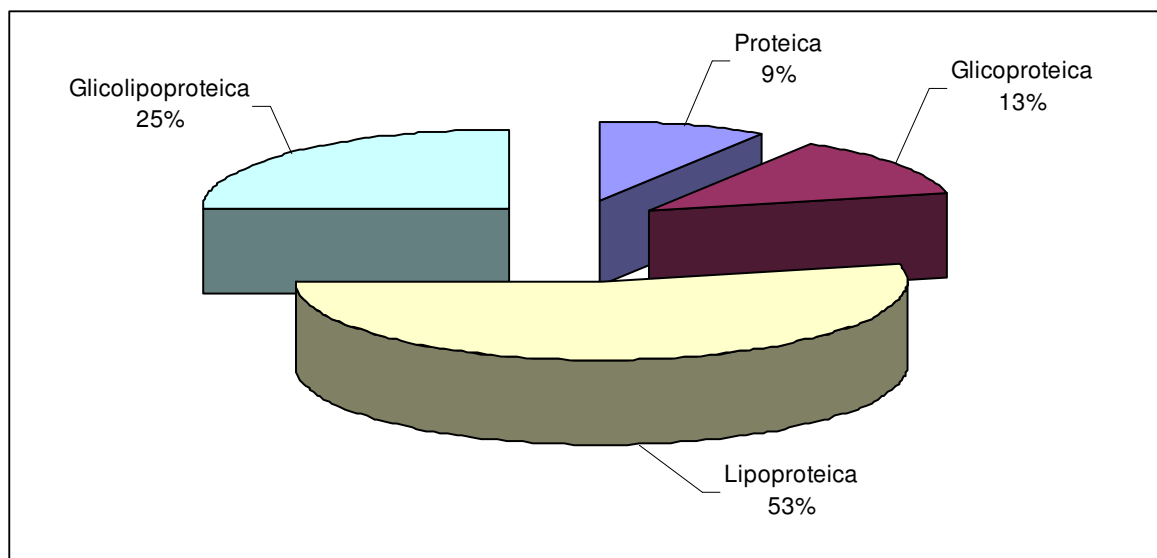
### 5.3 Caracterización fisicoquímica de sustancia antibacteriana

#### 5.3.1 Sensibilidad a catalasa

Después de su tratamiento con catalasa, todos los sobrenadantes tratados presentaron actividad inhibitoria frente al microorganismo indicador *L. acidophilus* ATCC 4356.

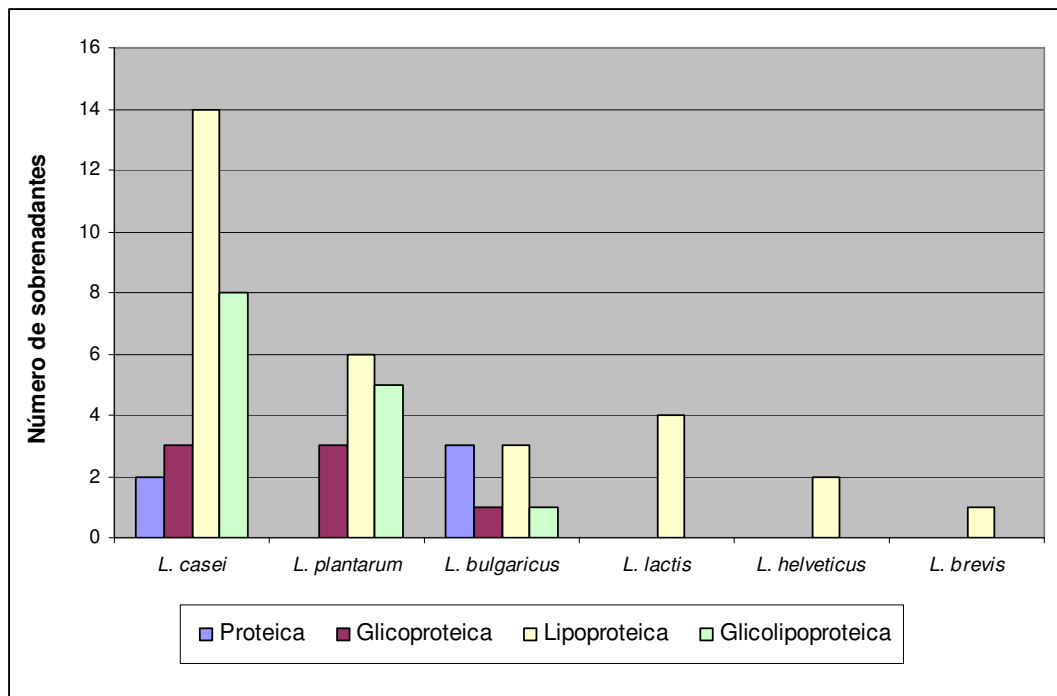
#### 5.3.2 Sensibilidad a enzimas

De los 56 sobrenadantes bacteriocinogénicos, el 53.6% presentó sensibilidad frente a las enzimas lipasa y pronasa E (lipoproteica), el 25% frente a  $\alpha$  - amilasa, lipasa y pronasa E (glicolipoproteica), el 12.5% frente a  $\alpha$  - amilasa y pronasa E (glicoproteica) y el 8.9% solamente frente a pronasa E (proteica) (Figura N° 4).



**FIGURA N° 4. Distribución porcentual de bacteriocinas de acuerdo a su naturaleza**

El número de sobrenadantes por especie de lactobacilo con pérdida de actividad frente a cada enzima, se muestra en la Figura N° 5. En este gráfico, se observa que la naturaleza lipoproteica predomina en la mayoría de los aislados por especie de lactobacilo.



**FIGURA N° 5. Determinación de la naturaleza de los sobrenadantes bacteriocinogénicos por especie de lactobacilo**

### 5.3.3 Estabilidad Térmica

Todas las bacteriocinas mantuvieron su actividad inhibitoria luego del tratamiento a 60 °C. Mientras que a 80 °C, sólo el 83.9% (47 sobrenadantes bacteriocinogénicos) presentó actividad. En el caso del tratamiento a 100 °C, ninguno de las bacteriocinas presentó actividad de inhibición. Se observa que a temperaturas menores de 80 °C, la actividad de las bacteriocinas es aparentemente constante.

Las bacteriocinas de *L. plantarum* LM1 y *L. casei* AB28.1 presentaron mayor resistencia a las temperaturas de 60 °C y 80 °C respectivamente. El halo de inhibición de las bacteriocina de *L. plantarum* LM1 a 60°C fue 16.3 mm, mientras que para la bacteriocina de *L. casei* AB28.1 a 80°C fue 13.2 mm. Las bacteriocinas de *L. casei* CH236, O291.7,